

Relatório do Seminário sobre estudos preliminares da Fosfoetanolamina Sintética (FOS)

O seminário, sediado no Instituto Nacional de Câncer, realizado em 17 de maio de 2016, teve o objetivo de promover a discussão dos resultados preliminares dos estudos de avaliação de segurança e eficácia da fosfoetanolamina sintética. Os estudos apresentados foram realizados por 3 grupos de pesquisadores a partir de encomenda do Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação (MCTI), como segue: Laboratório de Avaliação e Síntese de Substâncias Bioativas da Universidade Federal do Rio de Janeiro – Lassbio/UFRJ, em associação com o Laboratório de Química Orgânica Sintética –LQOS/Unicamp, Centro de Inovação de Ensaio Pré-clínicos (CIEnP) em Florianópolis/SC e Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos da Universidade Federal do Ceará (NPDM/UFC).

A abertura do evento contou com as presenças do Sr. Luiz Henrique Canto, representando o Secretário de Políticas e Programas de Pesquisa e Desenvolvimento do Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações, do Sr. Pedro Prata, Secretário-substituto de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos do Ministério da Saúde (SCTIE), da Sra. Doriane Patrícia Ferraz, representante da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) e do Sr. Luis Felipe Ribeiro Pinto, representando a direção do Instituto Nacional de Câncer (INCA).

Estavam presentes pesquisadores de várias instituições de pesquisa com experiência em pesquisas pré-clínicas ou desenvolvimento de fármacos (vide lista de presença anexa) e a coordenação de pesquisa do INCA, que, além da organização, teve o papel de moderador neste seminário. Foram convidados o Sr. Gilberto Chierice e sua equipe, que não responderam às três solicitações de comparecimento ao seminário. O Sr. Durvanei Augusto, pesquisador do Butantan e colaborador do grupo de sintetizadores da fosfoetanolamina foi convidado, mas respondeu que tinha impossibilidade de caráter familiar para comparecer ao seminário. Também foram convidados: o defensor público da União, Sr. Daniel de Macedo Alves Pereira, os deputados membros da Comissão de Seguridade Social e Família e o Senador Lasier Martins, da Comissão de Ciência, Tecnologia, Inovação, Comunicação e Informática do Senado. No entanto, nenhum desses convidados compareceu ao seminário.

O primeiro pesquisador a apresentar os dados foi o Professor Titular de Química, Sr. Luiz Carlos Dias, do LQOS/Unicamp. Foram apresentados os dados relativos às análises feitas nas cápsulas de FOS do Instituto de Química de São Carlos-USP, recebidas através do MCTI. Após análise do seu conteúdo verificou-se a seguinte composição:

- 32,2% de fosfoetanolamina;
- 34,9% de fosfatos de cálcio, magnésio, ferro, manganês, alumínio, zinco e bário;
- 3,6% de pirofosfatos de cálcio, magnésio, ferro, manganês, alumínio, zinco e bário;
- 18,2% de monoetanolamina protonada;
- 3,9% de fosfobisetanolamina;
- 7,2% de água.

A quantidade de bário presente nas amostras é de 0,0005% (5,2 ppm).

As cápsulas apresentavam heterogeneidade na composição e no peso do seu conteúdo. Esses dados demonstram a inexistência ou inadequação do necessário processo de purificação bem como a imprecisão no preparo das cápsulas, caracterizando a ausência de Boas Práticas Laboratoriais e Farmacêuticas (BPL e BPF) em todo o processo.

A 2ª etapa dos experimentos consistiu na síntese da FOS de acordo com o protocolo descrito na solicitação de registro de patente no Instituto Nacional de Propriedade Intelectual (INPI). Nessa síntese, foram encontrados os mesmos compostos contidos nas cápsulas analisadas, como pode ser visto abaixo nos gráficos do estudo de ressonância magnética, embora ausentes algumas informações metodológicas necessárias no protocolo da solicitação de registro da patente.

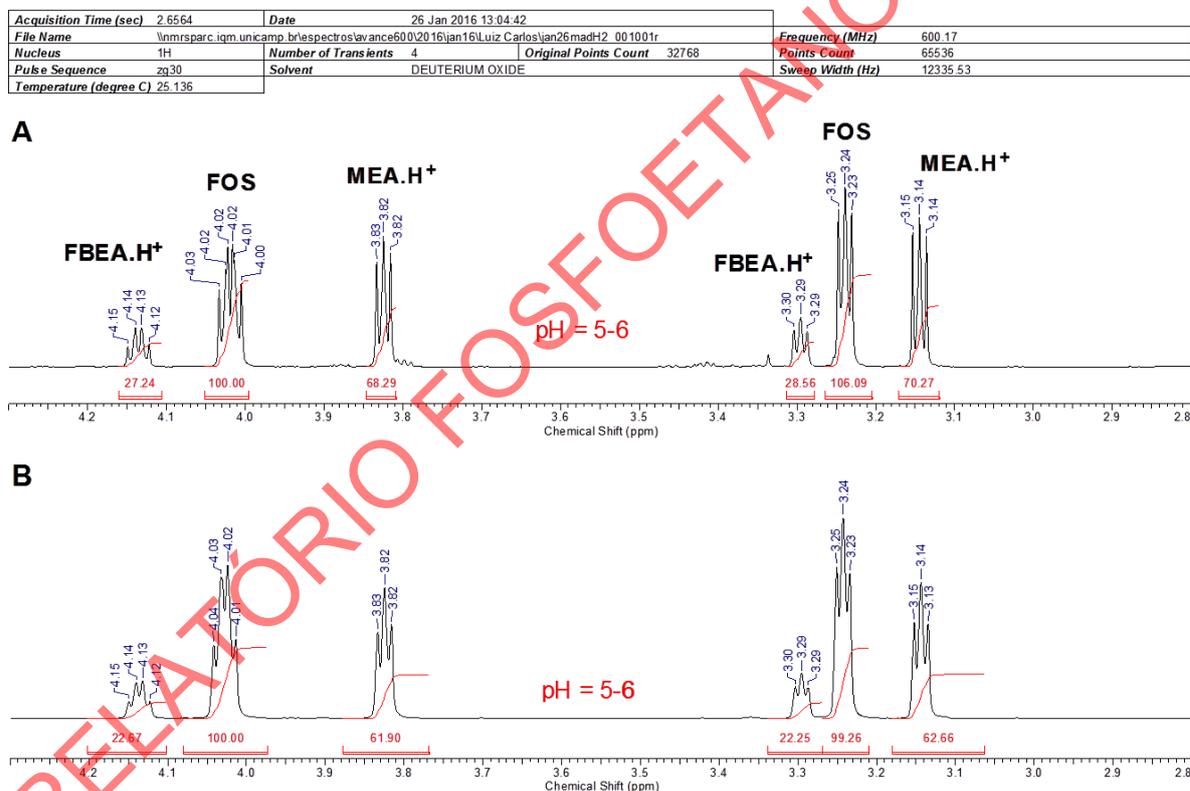


Fig 1: Espectro RMN-¹H (600 MHz - D₂O). Fração solúvel da cápsula IQSC-USP-MCTI (A) e mistura de FOS e FBEA.HCl sintetizadas no LQOS com monoetanolamina comercial (B).

O grupo do Professor Luiz Carlos Dias sintetizou em sua forma pura, os componentes fosfoetanolamina, cloridrato de monoetanolamina, fosfobisetanolamina, uma mistura na proporção 100:70 de Fosfoetanolamina e monoetanolamina, além de fornecer monoetanolamina pura e destilada para serem submetidas a ensaios in vitro e in vivo no CIEnP.

Em seguida, houve a exposição dos estudos pré-clínicos, com a apresentação do pesquisador João Calixto, responsável pelo CIEnP. Inicialmente, corroborando com os estudos realizados

pelo LQOS/Unicamp, o pesquisador comentou o laudo da USP, assinado pelo diretor do IQSC-USP, Dr. Germano Tremiliosi Filho, em que este declara que a FOS “fornecida pelo Sr. Salvador Claro Neto não é uma substância pura, contendo impurezas como a monoetanolamina... está classificada como substância tóxica, categoria 4, o que sugere que as cápsulas como fornecidas são inadequadas para consumo, especialmente por crianças, adolescentes e adultos com o sistema imunológico fragilizado por câncer...”.

Após essa introdução, passou a apresentar os resultados dos seguintes testes:

- 1) Avaliação das atividades citotóxica e antiproliferativa - foi realizada nos componentes da FOS, purificada no laboratório da Unicamp: fosfoetanolamina, monoetanolamina e fosfobisetanolamina. Os testes foram realizados *in vitro* em linhagens de células humanas de carcinoma de pulmão, carcinoma de pâncreas e melanoma, utilizando as metodologias de MTT, Vermelho Neutro e Sulforrodamina B. Dentre os compostos analisados, apenas a monoetanolamina mostrou alguma atividade citotóxica e antiproliferativa em células de câncer de pâncreas e melanoma, mas não de pulmão, sendo contudo, 3000 vezes menos potente que os antitumorais cisplatina e gencitabina, utilizados como controle positivo. A fosfoetanolamina e fosfobisetanolamina não apresentaram nenhuma atividade citotóxica ou antiproliferativa em nenhuma das três metodologias utilizadas.
- 2) Ensaios de Segurança - Dose Máxima Tolerada: seguindo os guidelines do FDA o teste é um estudo *in vivo* com camundongos e consiste na administração de doses crescentes da substância para testar a dose máxima tolerada e toxicidade ao tratamento com a FOS proveniente do IQSC. Assim, foram realizados testes com dose alta única, dose menor repetida por 7 dias e 3 doses diferentes em 3 grupos de animais por 28 dias, conforme preconizado no Guia da OECD n°. 407. Não houve toxicidade em nenhum dos esquemas administrados aos animais, tanto em machos como em fêmeas, embora fosse observada diminuição significativa no número de hemácias. Esses resultados são parciais, uma vez que as análises bioquímicas, de urina, de coagulação, pesagem de órgãos e estudos histopatológicos em diversos órgãos desses animais submetidos ao experimento ainda estão em andamento e dependem de financiamento para a sua conclusão.
- 3) Teste de genotoxicidade - para se iniciar um estudo Fase I toda substância precisa, obrigatoriamente, passar por um teste de genotoxicidade e carcinogenicidade. Foram seguidas as orientações do International Council for Harmonization of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use (ICH – S2 (R1)).
 - 3.a) Teste de mutação reversa em *S. typhimurium* (Teste de Ames) - realizado com base no guia 471 da OECD. A FOS foi testada em 5 linhagens com diferentes doses, sempre seguindo as BPL. A conclusão desse estudo foi que a FOS não apresentou efeitos citotóxicos ou genotóxicos nas condições experimentais utilizadas.

- 3.b) Teste de micronúcleos em medula óssea de camundongos - realizado com base no guia 4714 da OECD, para complementar a avaliação da genotoxicidade da substância. A FOS não apresentou efeitos citotóxicos ou genotóxicos nas condições experimentais utilizadas.
- 4) Avaliação de atividade antitumoral da FOS em camundongos *nude* portadores de tumor xenográfico de melanoma humano - as doses foram estabelecidas de acordo com os *guidelines* do FDA após o cálculo de transposição de dose inversa (humanos para camundongos). A FOS na dose de 200mg/Kg, administrada por via oral, não mostrou efeito antitumoral, enquanto na dose de 500mg/Kg esse efeito foi observado, embora inferior ao que se observou com a substância controle utilizada, a cisplatina, na dose de 2 mg/kg, via intra-peritoneal. Quando foram administrados os componentes purificados pela Unicamp, monoetanolamina na dose de 100mg/kg via oral e fosfoetanolamina pura na dose de 500mg/kg via oral, estes não foram capazes de inibir o tumor xenográfico de melanoma humano implantado em camundongos.

Finalizando, o pesquisador João Calixto observou que ainda necessitam ser concluídos estudos histopatológicos, de segurança, no SNC, sistemas respiratório e cardiovascular, bem como farmacocinética da FOS para que se possa prosseguir para os estudos de fase I.

Em seguida o pesquisador Odorico Moraes do Laboratório de Oncologia Experimental do NPDM/UFC apresentou os seus estudos com respectivos resultados:

- 1) Estudo do potencial citotóxico e antineoplásico da FOS - avaliação de potencial antiproliferativo e hemolítico da FOS *in vitro*. Esse estudo foi realizado seguindo as diretrizes do *National Cancer Institute* dos EUA com linhagens certificadas de células de carcinoma colorretal, de adenocarcinoma de próstata, de glioblastoma, além de fibroblasto e células mononucleadas de sangue periférico. Não foi observado efeito citotóxico nem atividade hemolítica com a metodologia utilizada.
- 2) Avaliação da possível atividade anticâncer da FOS no carcinossarcoma 256 de Walker - estudos *in vivo* em ratos Wistar transplantados com carcinossarcoma de Walker, submetidos a tratamento com 1000mg/Kg, via oral, por 10 dias, um grupo controle positivo tratado com ciclofosfamida na dose de 25mg/kg, via intraperitoneal, e um grupo controle negativo, tratado com soro fisiológico 0,9% na dose de 1mL por via oral. No grupo controle positivo não houve crescimento tumoral. No grupo tratado com a FOS e no grupo controle negativo o tumor cresceu significativamente. Foi realizada avaliação hematológica e bioquímica, bem como estudo histopatológico. Foram observadas alterações histopatológicas no fígado, embora as enzimas hepáticas plasmáticas não tenham se alterado. Foi observada maior proporção de metástase pulmonar no grupo tratado com FOS (7/15 com FOS vs. 3/15 no grupo controle negativo). Nesse estudo a conclusão final foi que a FOS não apresentou efeito inibidor do crescimento tumoral na dose utilizada.

Outro estudo foi realizado para verificar a possível atividade anticâncer da FOS, agora em animais com sarcoma 180, com as mesmas doses e vias de administração que o estudo anterior. Não houve qualquer inibição do crescimento tumoral no grupo tratado com a FOS. Estudos histopatológicos ainda estão em andamento nas 750 lâminas dos 8 órgãos que estão sendo estudados.

O pesquisador Odorico Moraes salientou em sua apresentação que convidou os Srs. Durvanei Augusto Maria e Renato Meneghelo, que pertencem ao grupo do Sr. Gilberto Chierice, para acompanharem os experimentos. Apenas o 2º acompanhou os experimentos com carcinoma de Walker.

Os pesquisadores (Sr. Luiz Carlos Dias, Sr. Odorico Moraes e Sr. João Calixto) apresentaram de forma completa e detalhada a metodologia utilizada nos estudos, assim como os resultados obtidos até o momento.

No período da tarde, ocorreram as apresentações dos representantes do Instituto Nacional de Propriedade Intelectual e da Agência Nacional de Vigilância Sanitária que falaram sobre patenteamento e a aprovação da substância no âmbito regulatório.

O Sr. Alexandre Lopes Lourenço do INPI relatou que foram depositados dois pedidos de patente: um de processo e outro em relação ao uso – com outras possibilidades de utilização, como antiproliferativo, neuroprotetor, antiepilético e apoptótico.

Segundo o representante do INPI as patentes ainda não foram analisadas, mas existe uma prerrogativa de que, sempre que houver interesse público, o Ministério da Saúde pode solicitar o exame prioritário de qualquer patente relacionada a medicamento.

A representante da Anvisa, Sra. Doriane Patrícia Ferraz de Souza Pompeu, relatou que Sr. Gilberto Chierice esteve na Agência em 2010 para buscar informações sobre os procedimentos de registro e na ocasião foram repassadas ao interessado todas as normativas e estudos que são necessários para o registro de um medicamento. Representantes do Ministério da Saúde informaram que em 2013 foi realizada uma reunião entre este Ministério e o Sr. Gilberto Chierice. À época, o Sr. Gilberto teria sido convidado pela SCTIE para apresentar o seu projeto, com vistas a um possível apoio do MS. Entretanto, ao final da reunião, o pesquisador teria recusado veementemente o apoio, além de afirmar que iria continuar distribuindo a substância à população.

A Sra. Doriane Patrícia ressaltou ainda que a regulação é um ato administrativo motivado e que a agência não pode conceder registro sem ser demandada e que, até o momento, não há nenhuma solicitação de registro da fosfoetanolamina sintética na Anvisa. Aberta a discussão para os demais pesquisadores convidados e após várias considerações, houve os seguintes consensos:

- 1) Todos os experimentos foram considerados válidos e realizados dentro das normas de boas práticas laboratoriais.
- 2) Há estudos experimentais que precisam ser concluídos no campo da toxicologia para que se possa prosseguir para estudos Fase I.
- 3) Há necessidade de aumentar o número de tipos de células tumorais (estudos *in vitro*) e de tipos tumorais em animais (estudos *in vivo*), para avaliação dos efeitos antineoplásicos da FOS .
- 4) O Ministério da Saúde irá solicitar ao INPI a urgência na análise da solicitação do registro de patente da FOS.
- 5) O Ministério de Ciência, Tecnologia e Inovação solicitará à PDTPharma o envio de um novo lote de fosfoetanolamina aos laboratórios para a continuidade dos estudos.
- 6) Deverá ser realizado um 2º seminário com esse grupo de pesquisadores convidados, para avaliar os dados pré-clínicos quando estes forem totalmente concluídos.

Com vistas ao princípio da transparência na administração pública, a reunião foi transmitida em tempo real por meio do canal do INCA no site Youtube.com e os arquivos podem ser acessados por meio dos links: <https://www.youtube.com/watch?v=q6Es2vn3IAw> e https://www.youtube.com/watch?v=fIP_cesJlnY.

RELATÓRIO FOSFOETANOLAMINA

Workshop Fosfoetanolamina

17 de Maio de 2016

Nome	Instituição	Assinatura
Alexandre Lopes Lourenço	Instituto Nacional de Propriedade Intelectual	
Andreia Cristina de Melo	INCA	Andreia C. de Melo
Arthur Eugen Kummerle	IQ/UFRRJ	Ausência Justificada
Claudia Masini D'avila Levy	SBPC	
Denise Pires de Carvalho	ICCF/UFRJ	Denise Pires de Carvalho
Doriane Patrícia	ANVISA	Doriane Patrícia
Eliezer Jesus de Lacerda Barreiro	UFRJ	Ausência Justificada
Francisco José Roma Paumgarten	FIOCRUZ	Francisco Roma Paumgarten
João Calixto	CIENSP/ABC	
João Paulo de Biaso Viola	INCA	
Jorge Carlos Santos da Costa	FIOCRUZ	
José Carlos do Valle	Academia Nacional de Medicina	Ausência Justificada
Lilian Ânima Bressan	DECIT	Lilian Bressan
Luis Felipe Ribeiro Pinto	INCA	
Luis Henrique Mourão do Canto	MCTI	
Luiz Carlos Dias	UNICAMP	Luiz Carlos Dias
Luiz Fernando Lima Reis	Hospital Sírio-Libanês	NÃO PODERÁ COMPARECER
Manoel Odorico de Moraes	Universidade Deferal do Ceará	
Marcus Vinícius Nora de Souza	Farmanguinho/FIOCRUZ	
Maria das Graças Henriques	Farmanguinho/FIOCRUZ	
Marisa Breitenbach	INCA	Marisa Breitenbach
Patrícia de Souza Boaventura	DECIT	
Pedro Reginaldo dos Santos Prata	DECIT	
Roger Chammas	USP	
Rui Manuel Reis	Hospital de Câncer de Barretos	
Thiago de Mello Moraes	MCTI	
José Morgano Diniz	INCA	
ZITA BYINGTON	INCA	
Gyven Lopes	INCA	Gyven Lopes
Gelson Mendes	COAS - INCA	